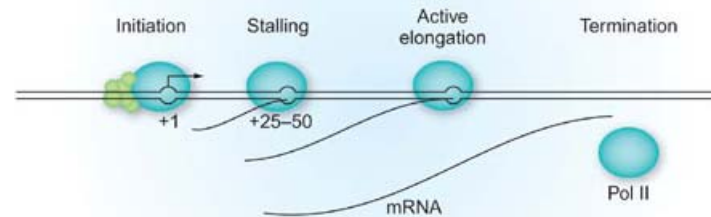
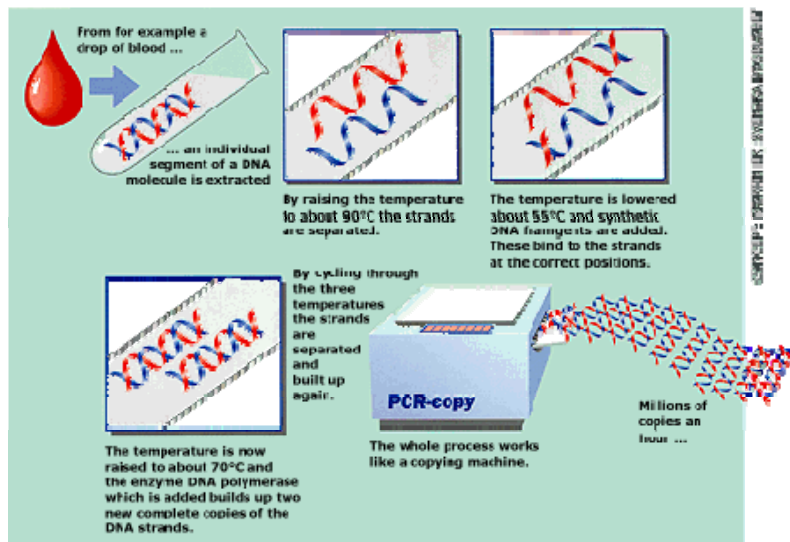
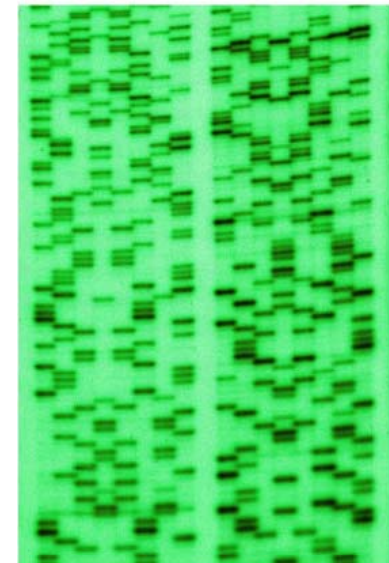


10. Methoden

➡ DNA Sequenzierung

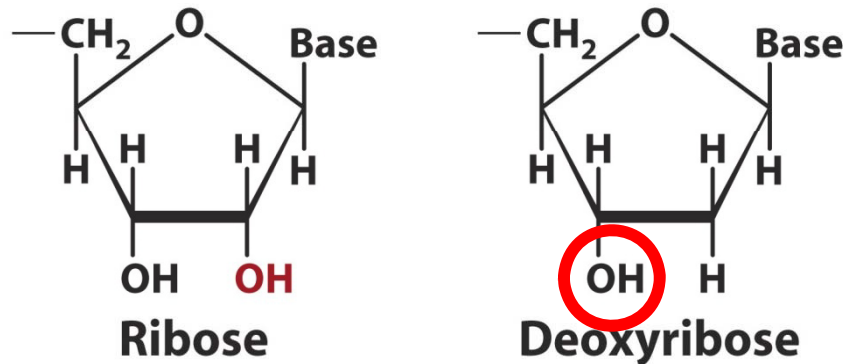
➡ Transkriptionsstart bestimmen

➡ PCR

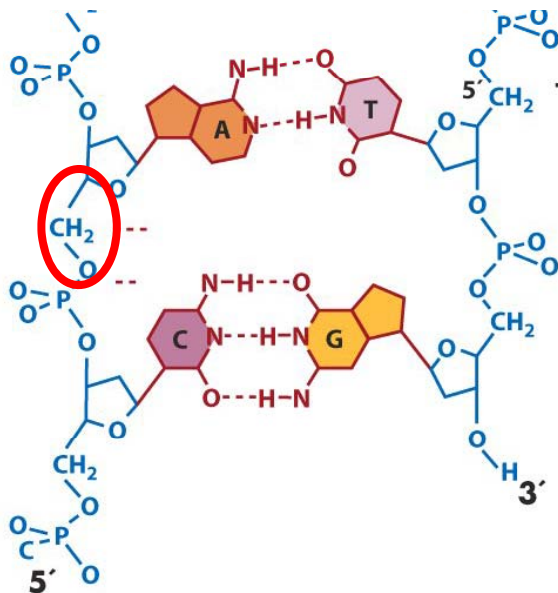


1. Erklären Sie das Prinzip der Sanger Sequenzierung. Klären Sie dabei folgende Punkte:

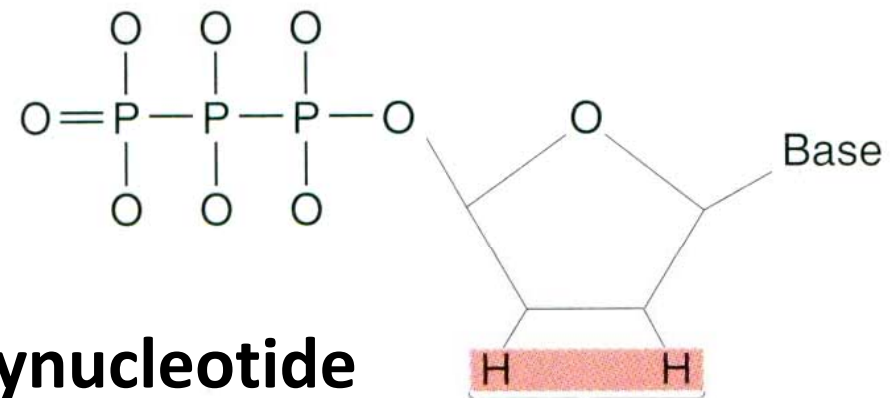
- Welche “besondere” Art von Nukleotiden wird verwendet und welche Funktion haben diese bei der Sequenzierungsreaktion?**
- Wie werden die Reaktionsprodukte analysiert bzw. visualisiert?
- Welche Art der DNA-Markierung hat die radioaktive Markierung bei der Sequenzierung verdrängt und welchen Vorteil bietet diese Methode?



**Deoxyribose + Phosphate + Base
= Deoxynucleotide**



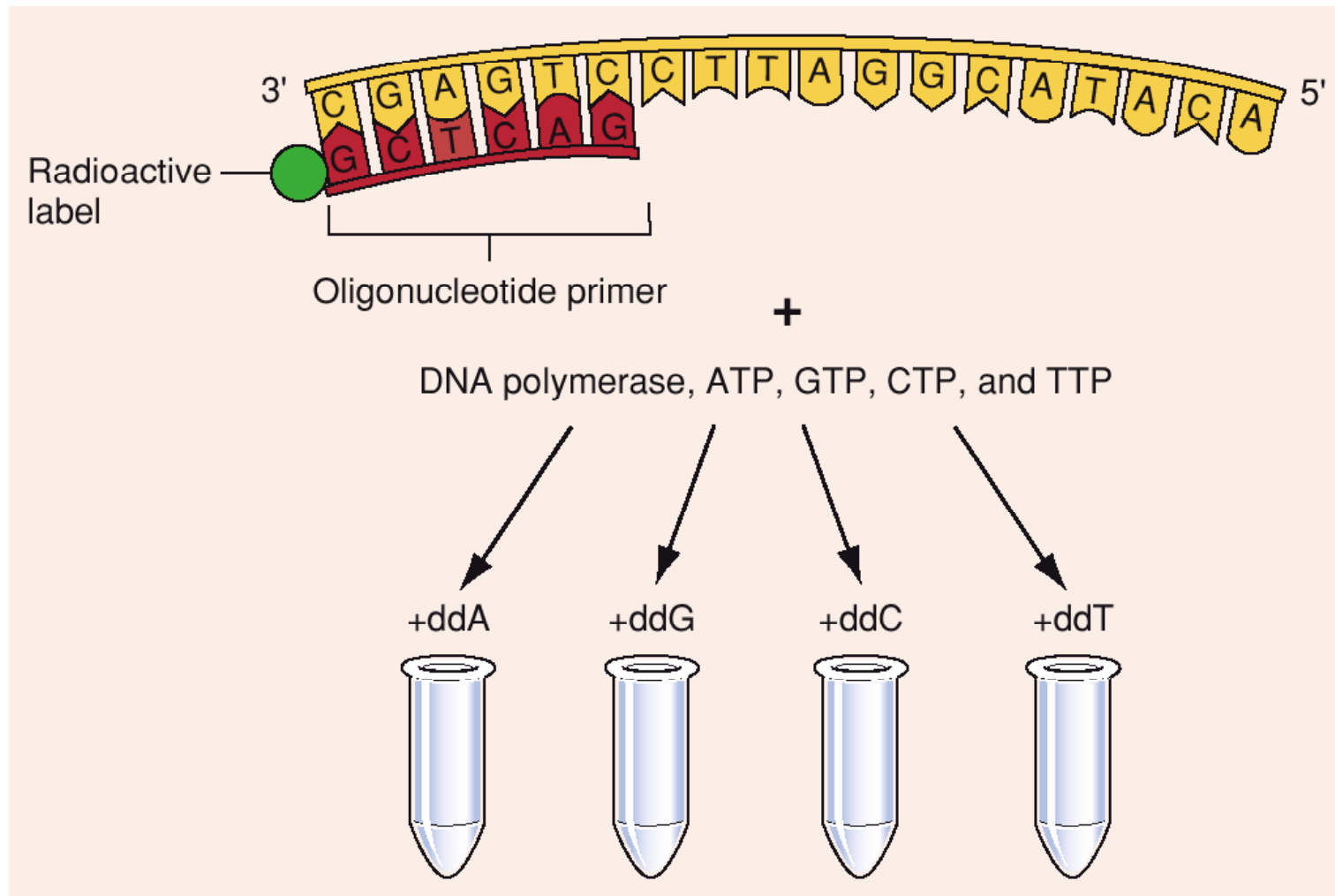
Dideoxynucleotide

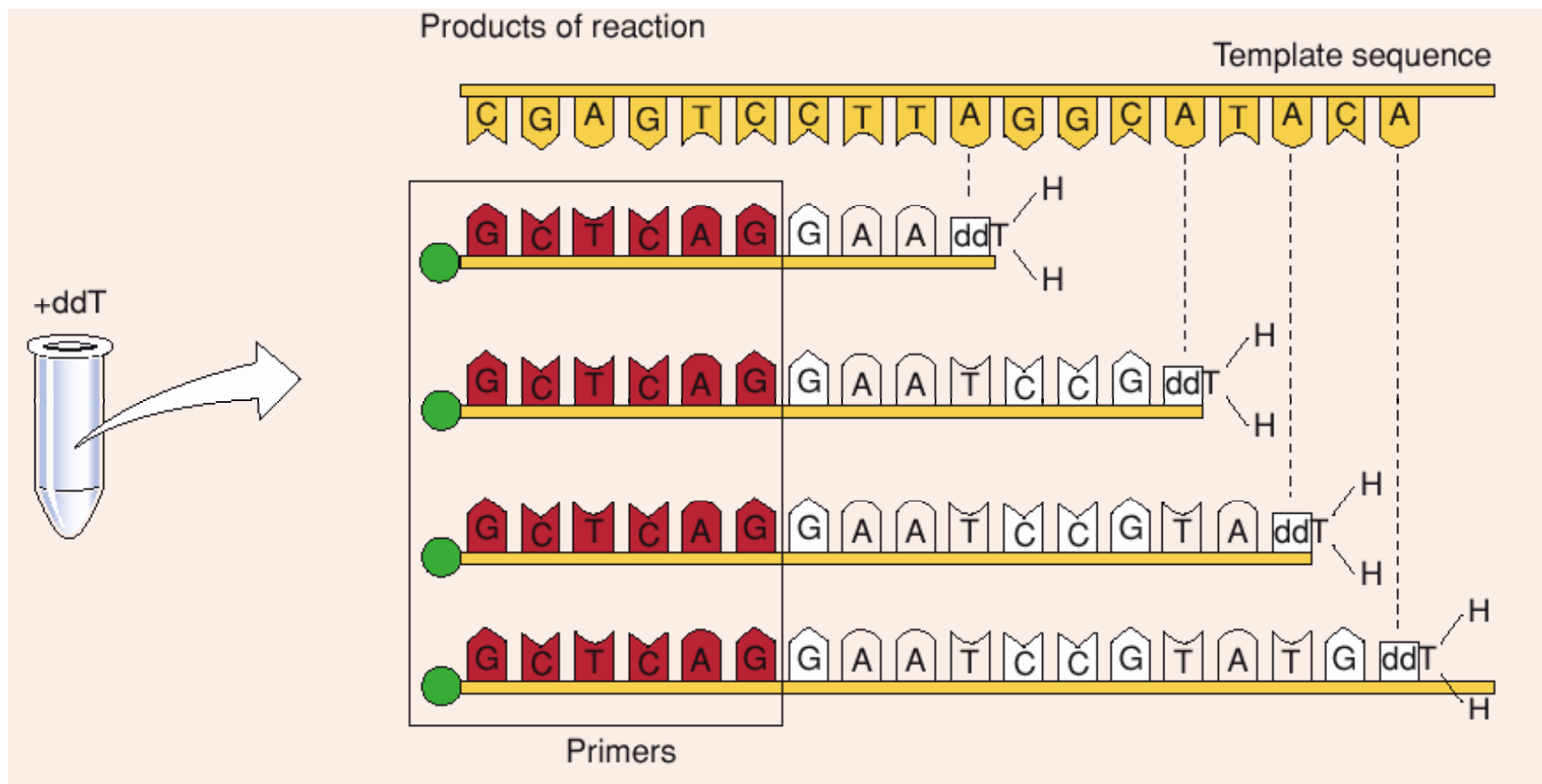


Cannot form a
phosphodiester bond
with next incoming dNTP

1. Erklären Sie das Prinzip der Sanger Sequenzierung. Klären Sie dabei folgende Punkte:

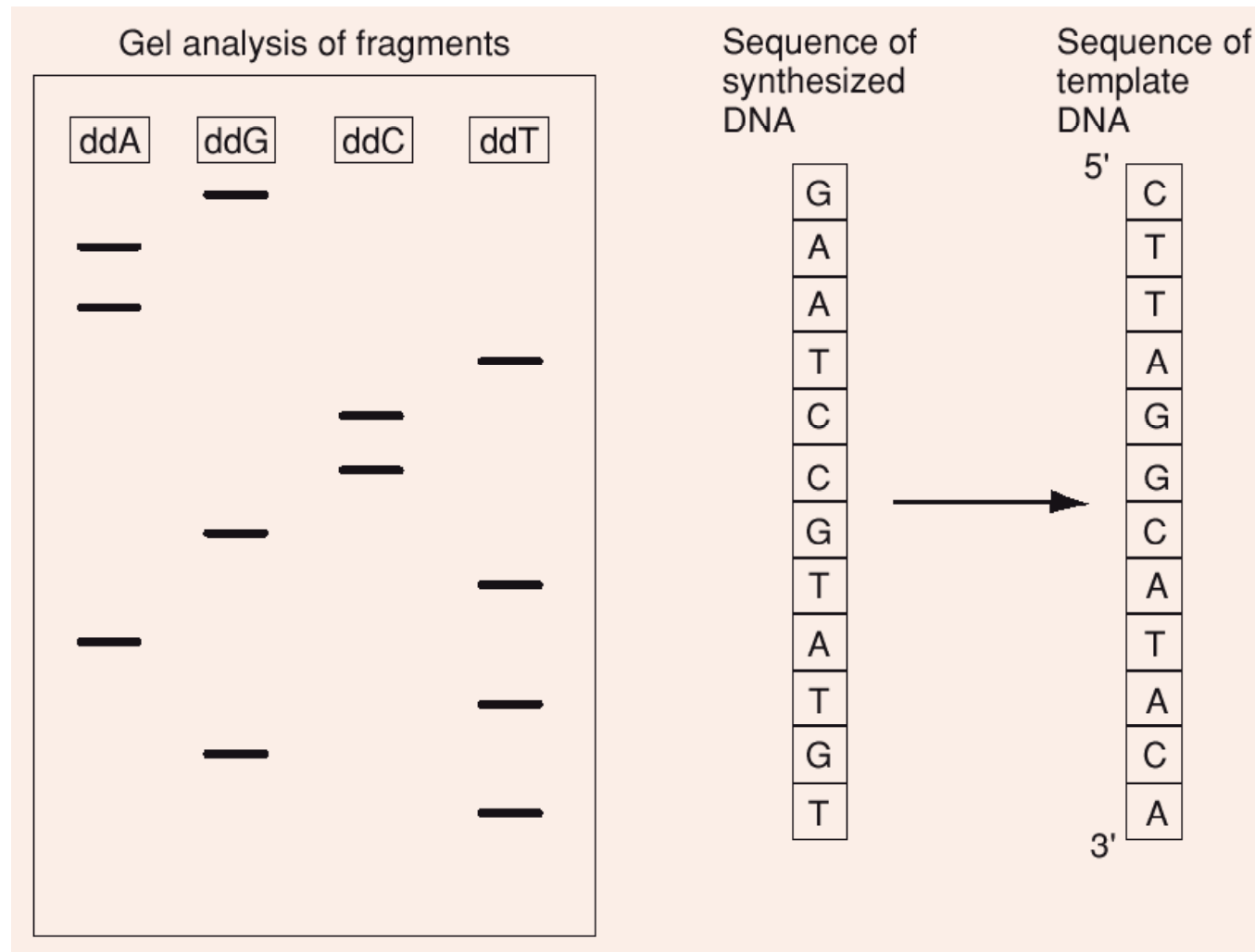
- Welche “besondere” Art von Nukleotiden wird verwendet und welche Funktion haben diese bei der Sequenzierungsreaktion?**
- Wie werden die Reaktionsprodukte analysiert bzw. visualisiert?
- Welche Art der DNA-Markierung hat die radioaktive Markierung bei der Sequenzierung verdrängt und welchen Vorteil bietet diese Methode?



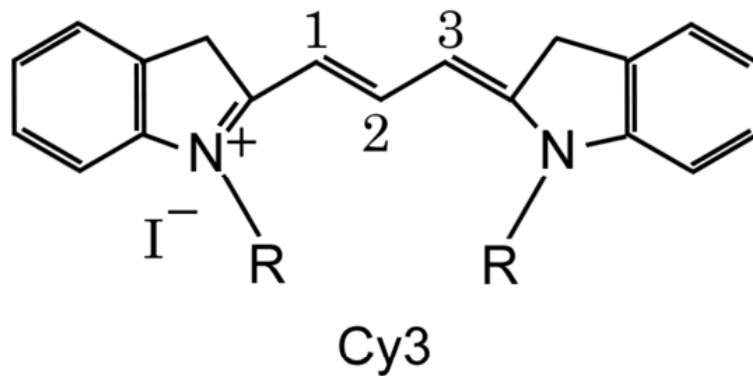
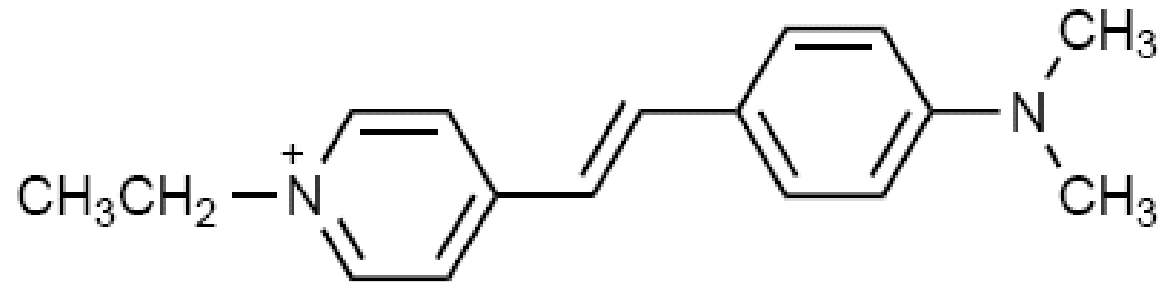


1. Erklären Sie das Prinzip der Sanger Sequenzierung. Klären Sie dabei folgende Punkte:

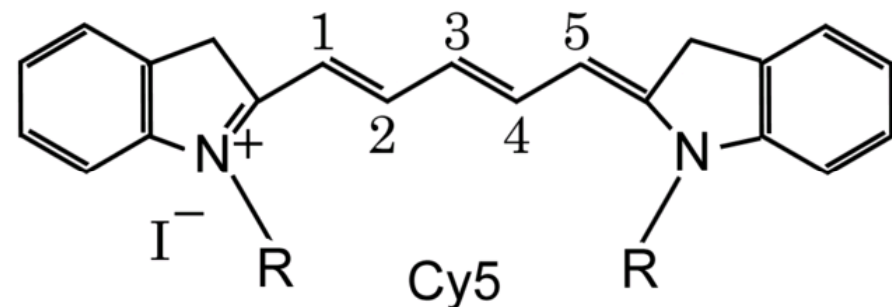
- Welche “besondere” Art von Nukleotiden wird verwendet und welche Funktion haben diese bei der Sequenzierungsreaktion?
- Wie werden die Reaktionsprodukte analysiert bzw. visualisiert?**
- Welche Art der DNA-Markierung hat die radioaktive Markierung bei der Sequenzierung verdrängt und welchen Vorteil bietet diese Methode?



1. Erklären Sie das Prinzip der Sanger Sequenzierung. Klären Sie dabei folgende Punkte:
- a) Welche "besondere" Art von Nukleotiden wird verwendet und welche Funktion haben diese bei der Sequenzierungsreaktion?
 - b) Wie werden die Reaktionsprodukte analysiert bzw. visualisiert?
 - c) **Welche Art der DNA-Markierung hat die radioaktive Markierung bei der Sequenzierung verdrängt und welchen Vorteil bietet diese Methode?**



rot (550nm → 570 nm)



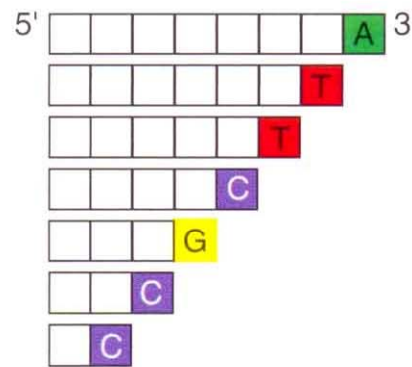
dunkelrot (649nm → 670 nm)

1. Erklären Sie das Prinzip der Sanger Sequenzierung. Klären Sie dabei folgende Punkte:

- Welche “besondere” Art von Nukleotiden wird verwendet und welche Funktion haben diese bei der Sequenzierungsreaktion?
- Wie werden die Reaktionsprodukte analysiert bzw. visualisiert?
- Welche Art der DNA-Markierung hat die radioaktive Markierung bei der Sequenzierung verdrängt und welchen Vorteil bietet diese Methode?**

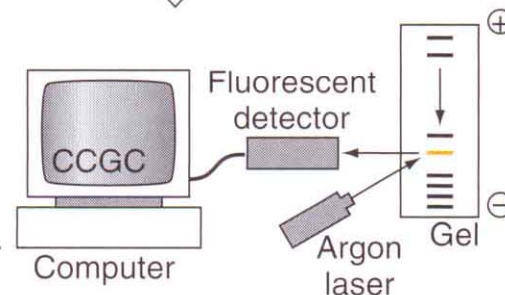
(a) Automated sequencing

1. Generate nested array of fragments; each with a fluorescent label corresponding to the terminating 3' base.



2. Fragments separated by electrophoresis in a single vertical gel lane.

3. As migrating fragments pass through the scanning laser, they fluoresce. A fluorescent detector records the color order of the passing bands. That order is translated into sequence data by a computer.



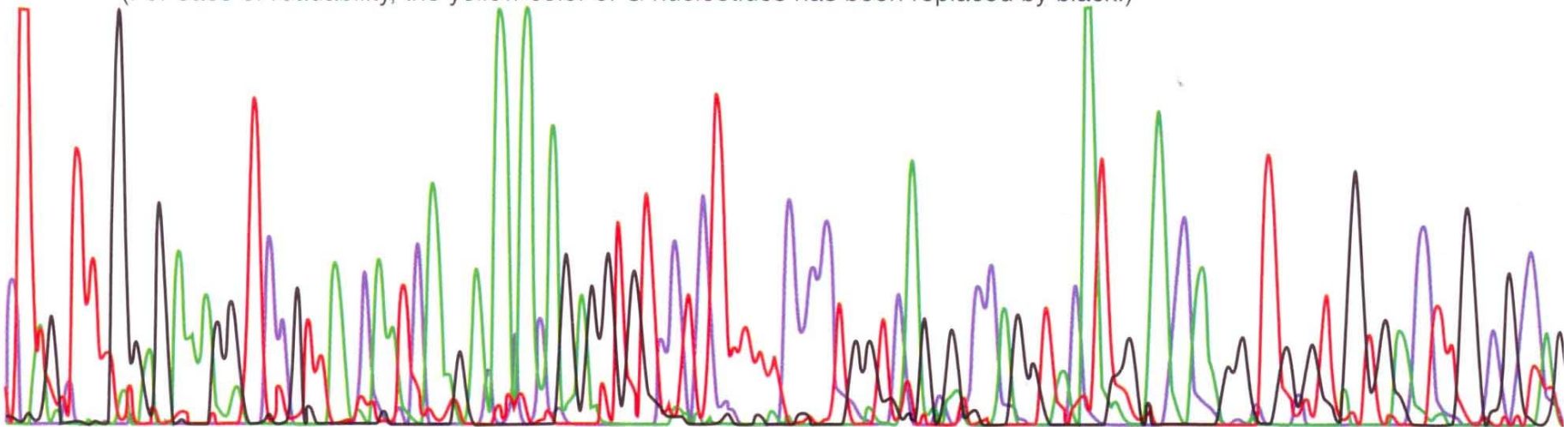
(b) Fluorescent bands in a sequencing gel.



(c) Computer readout

CTNGCTTTGGAGAAAGGCTCCATTGNCAATCAAGACACACAGAGGTGTCCTCTTTTTCCCTGGTCAGCGNCCAGGTACATNGCACCAAGGCTGCGTAGTGAAC TTGNCACCAAC

(For ease of readability, the yellow color of G nucleotides has been replaced by black.)



2. Mittleweile ist die Sanger Methode die am häufigsten genutzte Methode zur Sequenzierung.

- Welche andere Methode zur Sequenzierung kennen Sie noch?
- Erklären sie die Prinzipien dieser Art der Sequenzierung.
- Gibt es Umstände unter denen ein Sanger Sequenzierung nicht möglich ist und die alternative Form der Sequenzierung verwendet wird?

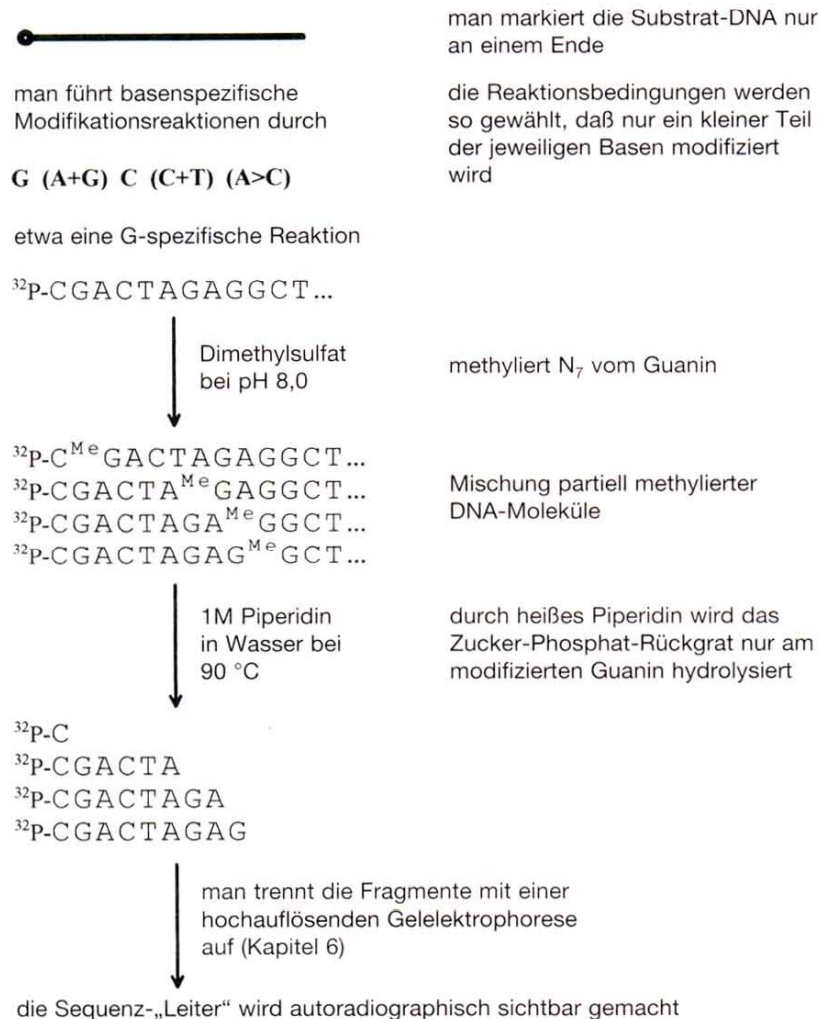
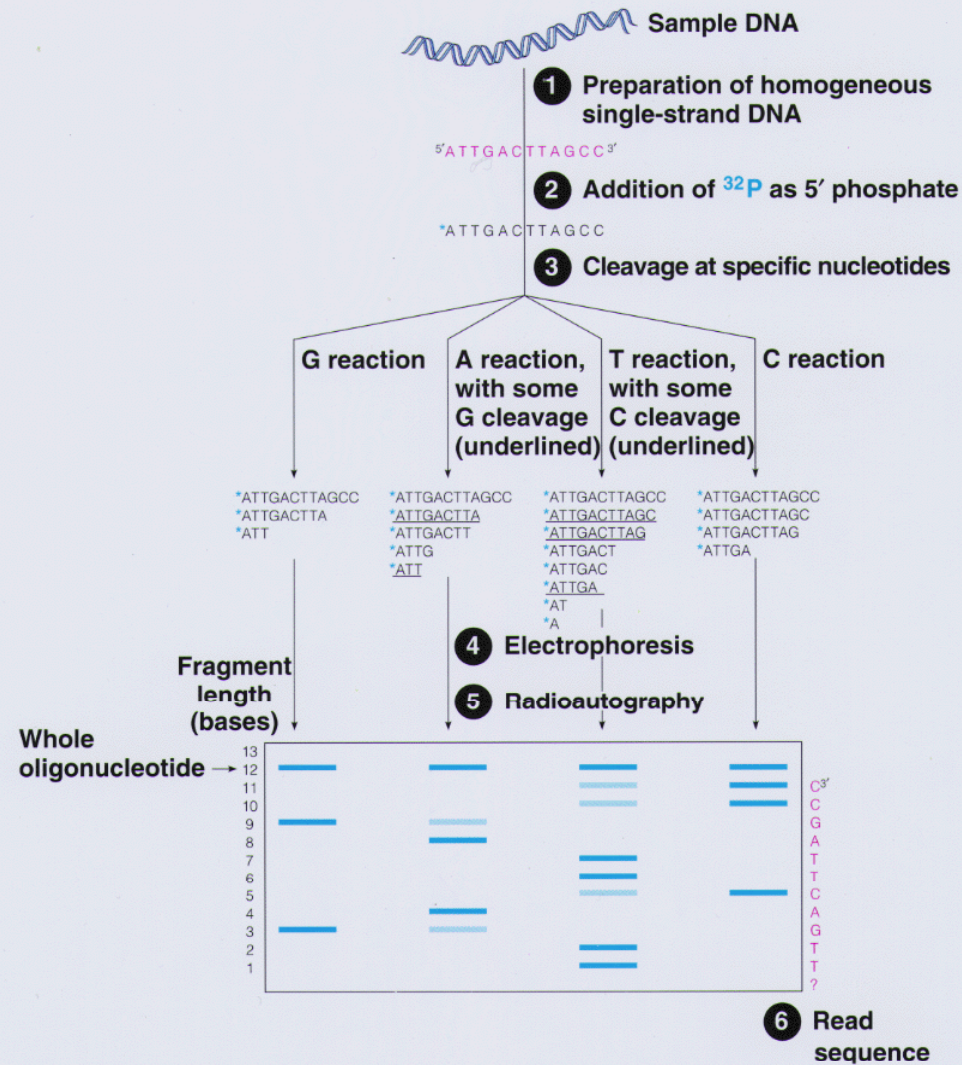


Tabelle 2.1: Basenspezifische Reaktionen für die Technik des chemischen Abbaus

Reagenz	betroffene Base(n)
Dimethylsulfat pH 8,0	G
Piperidininformiat pH 2,0	A+G
Hydrazin	C+T
Hydrazin + 1,5 M NaCl	C
heiße Natronlauge (90°C; 1,2 M NaOH)	A>C

Diese Reagenzien modifizieren bei einer Reaktion mit DNA bestimmte Basen. Heißes Piperidin (1M in Wasser, 90°C) spaltet anschließend das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA nur da, wo eine Base modifiziert wurde. Heiße Natronlauge (A>C) spaltet bevorzugt bei A sowie weniger häufig bei C. Darüber hinaus gibt es weitere basenspezifische Reaktionen [3].

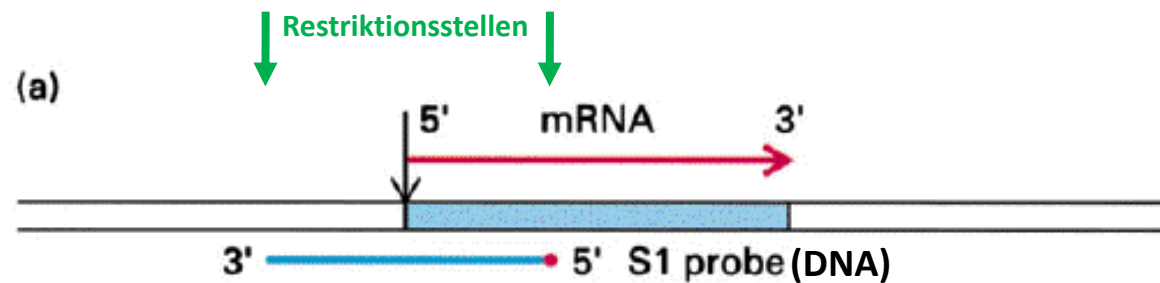
Figure 4A.4 Sequencing an oligonucleotide by the Maxam-Gilbert method



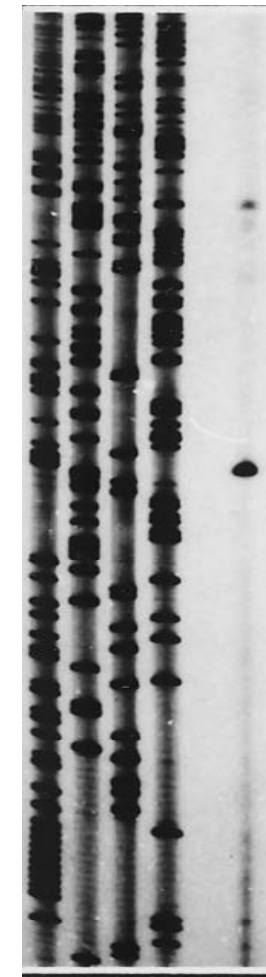
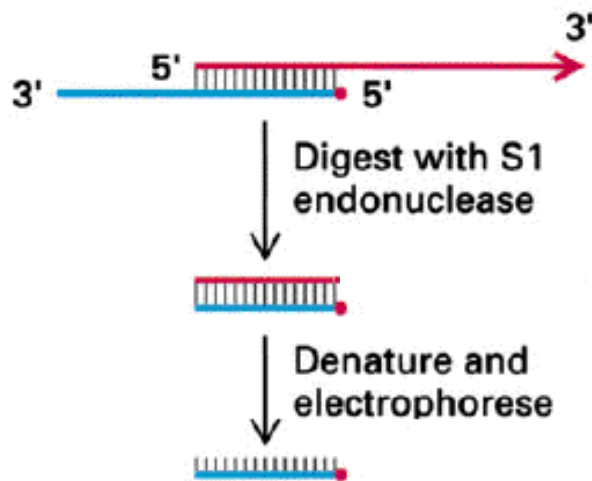
Maxam-Gilbert pro	Maxam-Gilbert contra
Sequenz unbekannter DNA entschlüsselbar → kein Primer notwendig	Sequenzen relativ kurz
Sequenz bis nah an den Beginn des Fragmentes → 2-3 bp	Reaktionen langsamer
Sequenz stammt vom originalen DNA Fragment → nicht von DNA Polymerase Kopie	Höhere Fehlerrate
Für repetitive Sequenzen geeignet	Gefährliche Chemikalien erforderlich

3. Sie haben ein kloniertes DNA Fragment welches unter anderem eine kodierende Sequenz umfasst.

- a) **Erklären Sie wie man mittels Nuklease-S1-Kartierung das 5' bzw. 3' Ende der korrespondierenden mRNA bestimmen kann.**
- b) Erklären Sie den alternativen Ansatz zur Kartierung der mRNA die sogenannte Primer-verlängerung ("Primer-Extension").



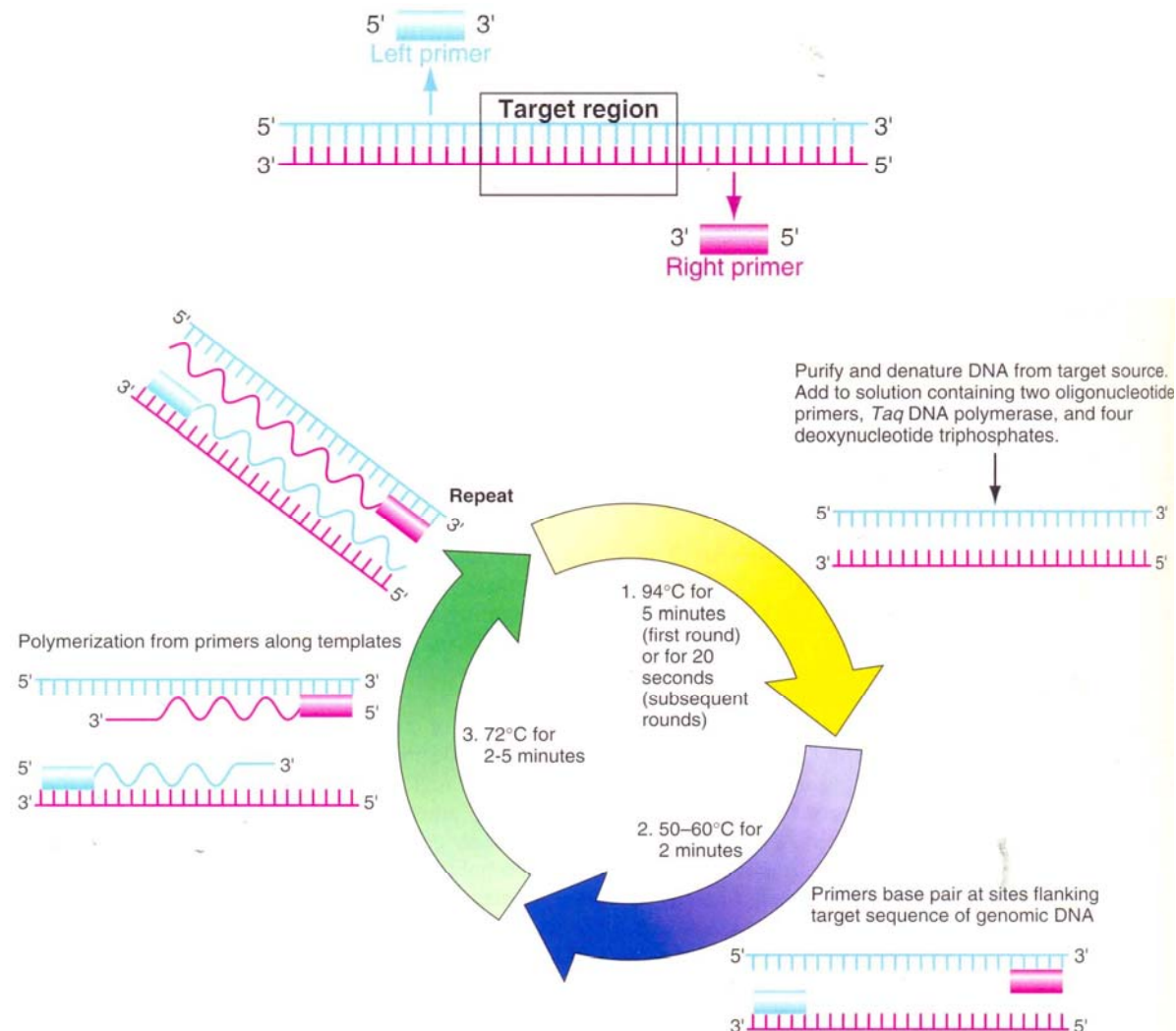
(b) S1 Nuclease mapping

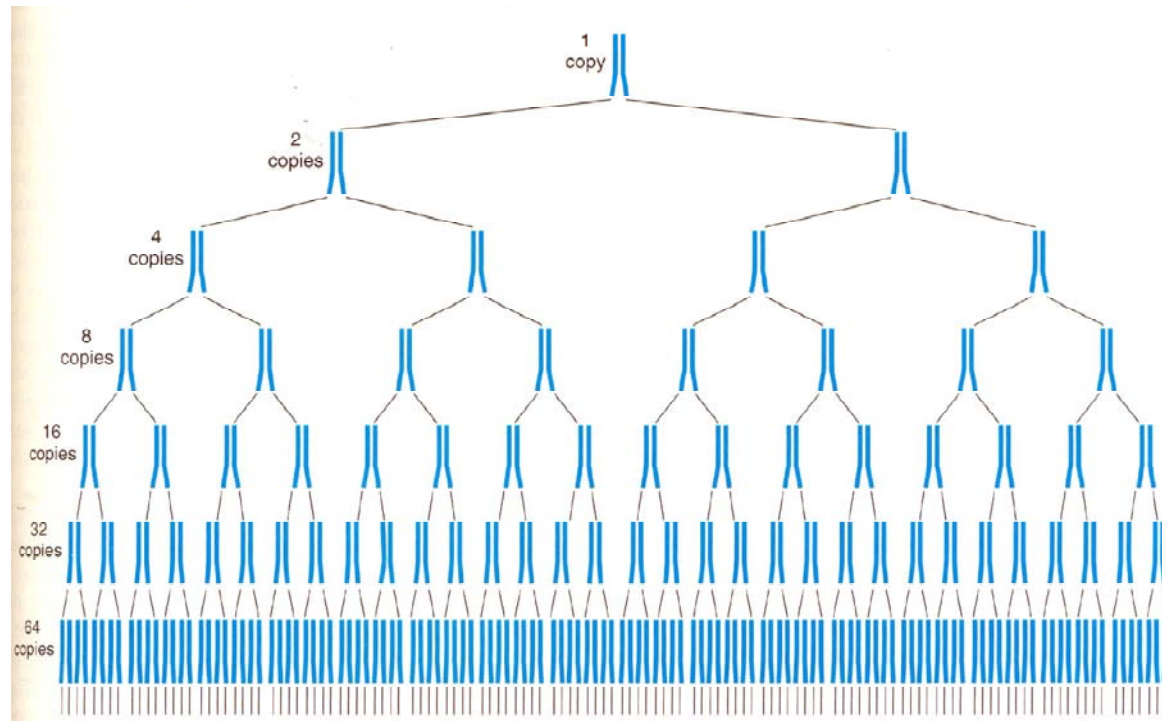
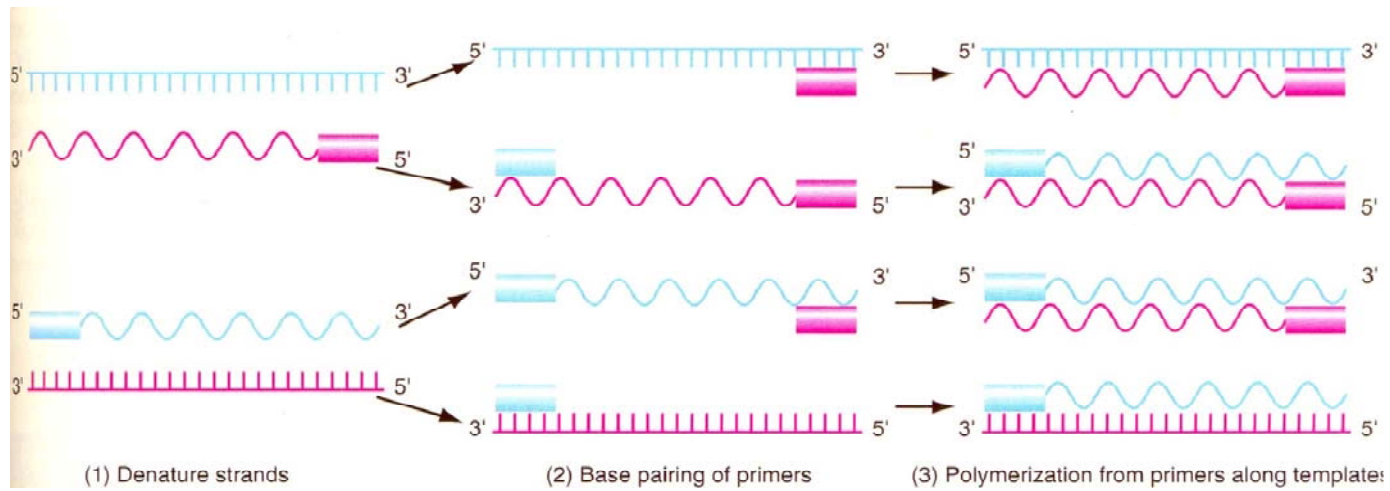


ACG T 1

4. Erklären Sie die Grundprinzipien der PCR. Klären sie in diesem Zusammenhang:

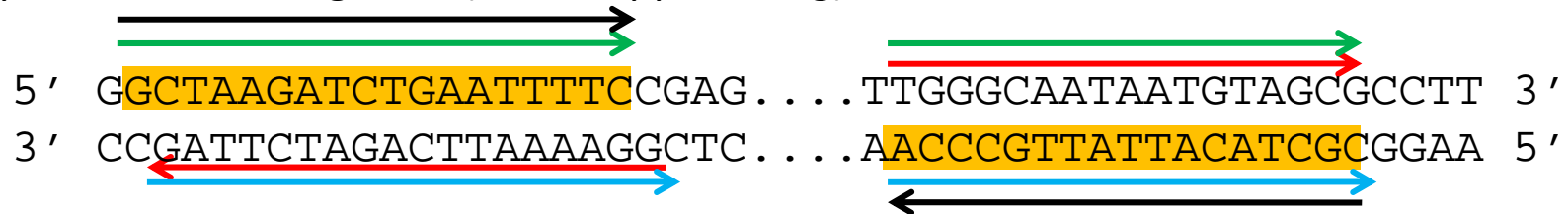
- Welche Reaktionskomponenten eingesetzt werden.
- Welche Temperaturen in den verschiedenen Phasen der PCR vorliegen und was bei diesen Temperaturen passiert.
- Welche Produkte bei der PCR entstehen und wie sich diese bei der PCR vermehren (lineare oder exponentielle Amplifikation).





5. Sie wollen mittels PCR ein DNA Fragment amplifizieren (Anfang und Ende des Fragments sind schematisch dargestellt). Welches der folgenden Primerpaare können Sie für diese PCR benutzen?

Zu amplifizierendes Fragment (DNA Doppelstrang):



Primerpaare

- a) 5' **GGAAAATTCAGATCTTAG** 3' ; 5' **TGGGCAATAATGTAGCG** 3'
- b) 5' **GCTAAGATCTGAATTTTC** 3' ; 3' **AACCCGTTATTACATCGC** 5'
- c) 3' **GATTCTAGACTTAAAGGC** 5' ; 3' **AACCCGTTATTACATCGC** 5'
- d) 5' **GCTAAGATCTGAATTTTC** 3' ; 5' **TGGGCAATAATGTAGCG** 3'

Fröhliche
Weihnachten!



Nächste Übung:
12.01.2010